

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-505610

(43)公表日 平成8年(1996)6月18日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A 61 K 38/00

9/08

9/14

識別記号

序内整理番号

F I

G 9455-4C

9455-4C

9455-4C

A 61 K 37/02

9/14

L

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平6-514767
(36) (22)出願日	平成5年(1993)12月15日
(85)翻訳文提出日	平成7年(1995)6月16日
(86)国際出願番号	PCT/EP93/03544
(87)国際公開番号	WO94/14466
(87)国際公開日	平成6年(1994)7月7日
(31)優先権主張番号	P 4 2 4 2 9 1 9 . 6
(32)優先日	1992年12月18日
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, BG, BR, CA, C Z, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, PL, RO RU, SK, UA, US

(71)出願人	ベーリンガー マンハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国, デ—68298 マンハイム, サンドホーフエル シュトラーゼ 116
(72)発明者	ミヒヤエリス, ウベー ドイツ連邦共和国, デ—82362 バイルハイム, プエトリッヒシュトラーゼ 25
(72)発明者	ルドルフ, ライネール ドイツ連邦共和国, デ—82362 バイルハイム, フェールベルガッセ 17
(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外3名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】貯蔵安定性なG-CSFの水性薬理製剤

(57)【要約】

本発明は、貯蔵安定性であり、且つ酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びそれらの塩、又はアルギニン及びその塩の群より選ばれる少なくとも一の緩衝剤を各ケースにおいて安定化のために100mmol/l以下濃度で含むG-CSFの水性薬理製剤に関する。

**【特許請求の範囲】**

1. 治療的に有効な量のG-CSFと、酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩又はアルギニン及びその塩を含んで成る群から選ばれる少なくとも一の緩衝剤とを含む安定な水性薬理製剤であって、その既時投与型溶液中のこの緩衝剤の最終濃度が2～100mmol／1である、製剤。
2. 前記リン酸塩の濃度が5～80mmol／1であり、そして前記既時投与型溶液のpH値が約3.5～5又は7～8の値に調整されている、請求項1記載の製剤。
3. 前記クエン酸塩の濃度又は前記マレイン酸塩の濃度が5～40mmol／1であり、そして前記溶液のpH値が約2.5～3.5又は7～8の値に調整されている、請求項1記載の製剤。
4. 前記緩衝剤としてのリン酸塩とクエン酸塩との総濃度が5～40mmol／1であり、そしてその溶液のpH値が約2.5～3.5又は7～8に調整されている、請求項1記載の製剤。
5. 前記酢酸塩の濃度又は乳酸塩の濃度が5～80mmol／1であり、そして前記溶液のpH値が約3.5～5の値に調整されている、請求項1記載の製剤。
6. 前記リン酸アルギニン、塩化アルギニン又はクエン酸アルギニン緩衝剤の濃度が5～80mmol／1であり、そして前記溶液のpH値が好ましくは約7～8に調整されている、請求項1記載の製剤。
7. 前記溶液が、使用したG-CSFの量以下の量の界面活性剤を含む、請求項1～6のいづれか1項記載の製剤。
8. 前記溶液が、最大で0.5mg／ml、好ましくは0.01～0.1mg／mlの量の界面活性剤を含む、請求項7記載の製剤。
9. 前記溶液が更に一般的な助剤又は等張性剤を含む、請求項1～8のいづれか1項記載の製剤。
10. 前記溶液がポリマー又はタンパク質様助剤を含まない、請求項1～9のいづれか1項記載の製剤。
11. G-CSFを含む安定な水性薬理製剤の調整のための方法であって、薬理学的に有効な量のG-CSFを、酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びそ

の塩、又はアルギニン及びその塩を含んで成る群から選ばれる少なくとも一の緩衝剤と混合する方法であり、ここでその緩衝剤の量は既時投与型溶液中のこの緩衝剤の最終濃度が $2\sim100\text{mmol}/1$ となるように選ぶ、方法。

12. G-CSFを含む水性薬理製剤を安定化するための方法であって、酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩、又はアルギニン及びその塩を含んで成る群から選ばれる少なくとも一の緩衝剤を、濁りを防ぐための安定剤としてその既時投与型溶液の中で $2\sim100\text{mmol}/1$ の最終濃度において使用する、方法。

13. G-CSFを含む水性薬理製剤の場合における濁りの防止のための酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩、又はアルギニン及びその塩の利用。

14. 請求項1～10のいづれか1項記載の製剤から製造した凍結乾燥品又は粉末。

15. 請求項13記載の凍結乾燥品又は粉末を水又は水性溶液の中に溶かすことにより製造した、請求項1～10のいづれか1項記載の製剤。

### 【発明の詳細な説明】

#### 貯蔵安定性なG-CSFの水性薬理製剤

本発明は、貯蔵安定性であり、且つ酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びそれらの塩又はアルギニン及びその塩の群より選ばれる少なくとも一の緩衝剤を各ケースにおいて安定化のために $100\text{mmol}/1$ 以下の濃度で含むG-CSFの水性薬理製剤に関する。

G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）を含む様々な薬理製剤が既に当業界で知られている。

G-CSFを含む薬理製剤はDE 37 23 781 (GB2, 193, 631号) に記載されており、これは少なくとも一の薬理学的に許容される界面活性剤、サッカライド、タンパク質又は高分子化合物をG-CSFの安定化のために含む。安定化剤としてヒト血清アルブミンを含む製剤が提案されている。特に、使用するG-CSFの量の1~1000倍に相当する重量部において界面活性剤を含む製剤が有利であると記載されている。

G-CSFの安定化製剤はEP0, 373, 679号に記載され、これは酸性の溶液pH値を特徴とし、可能な限り低い導電率を有する。この溶液が例えば緩衝剤又はマンニートールの如くの薬理助剤を更に含む場合、その溶液は3~3.7のpH値を有する。もし緩衝剤がその薬理配合物の中に存在しているなら、2.75~4のpH域が有利であると述べられている。

ヒトタンパク質製剤の安定化凍結乾燥品がEP0, 306, 824号に記載されており、その安定化は尿素、アミノ酸及び清浄剤の混合物の添加により達せられている。

先のPCT特許出願PCT/EP92/01823号において、点滴及び注射を目的とするG-CSFを含む寛容性のよい薬理剤の製造プロセスが述べられている。液状投与形態は特に低滴定酸性度及び低緩衝能を特徴とする。G-CSFを含む記載の点滴及び注射溶液のpH値は3.8~4.5の酸性域にある。

防腐剤を更に含むG-CSF含有液状形態薬理剤の製造プロセスがPCT/EP92/0182より公知にされている。薬理溶液のpH値は2.5~4.5の酸性域にある。この場合、G-CSFの安定化は、G-CSFにとって好適な酸性pH値を設定することにより、

及び様々なアミノ酸の混合物の添加により本質的に達せられる。

ところで、従来公知のG-CSFのための薬理配合物はいくつかの欠点を有する。DE 37 23 781号に記載の薬理製剤は薬理添加剤又は助剤を含むが、それらは医学の見地から、無害と単純に判定することはできない。ポリマー及びタンパク質はその起源及びその生理化学的特性に基づき、薬理添加剤としてのその適正について一定の残留的な危険性を有している。ヒト又は動物起源のタンパク質及び細胞培養物より獲得したタンパク質はウィルス汚染の潜在的な残留的危険性を抱えている。分析学上検出困難な他のタンパク質様不純物はその抗原特性に基づきヒトにおいて免疫反応をも引き起こす。更に、動物起源のタンパク質は一般にその種一特異性特性に基づきヒトにおける免疫反応を誘引しうる。かかるタンパク質の後の再投与後の長期反応も考えられる。

高分子量化合物の添加も問題となりうる。ポリマーはその高分子量に原因して体内に蓄積することがあり、そしてそれ故生分解が生じないとしたら体内に長期間残留し続けうる。これは皮下投与の場合に特に危険であり、なぜなら血流を介する排除及び分散は静脈投与に比べてはるかに遅いからである。ポリマーはその分子量に依存して抗原特性も有しうる。更に、ポリマーの純度は保障することが

難しく、その理由はその製造に用いた触媒又はモノマー及びその他のポリマーフラグメントの存在にある。液状投与薬理形態におけるポリマーの使用は従って、皮下投与できる薬理剤の形態の場合に特に、可能ならば避けるべきである。

DE 37 23 781号に記載の界面活性剤の量も医学的な見地から問題であると考えるべきである。それにおいては界面活性剤の濃度は、G-CSFの重量に比例して1 10,000重量部の界面活性剤で存在していることが有利であると記載されている。一方、もし臨床的使用にとってのG-CSFの好適な適用濃度が最終薬理配合物において0.05~1.5 mg/mlであると考えるなら、このことは対応の高界面活性剤濃度をもたらしてしまう。このことは医学的見地から避けるべきであり、なぜならそれらは局部刺激を引き起こしうるからである。

上記の配合物の欠点は、特に皮下投与の場合に、それらが、使用する低pH値に基づき、患者において局部的な不耐を招いてしまうことにある。得られる製品は

敏感な患者において痛み及び局部組織刺激を引き起こしてしまうことがある、なぜなら組織において存在している7.0~7.5の生理学的pH域はそれに適合しないからである。

更に、特にG-CSFの非グリコシル化形態はCHO細胞から獲得したグリコシル化G-CSFに比べて極めて不安定であることが文献から公知となっている (J. Biol. Chem. 1990, 265, 11432)。G-CSFの非グリコシル化形態の安定化は従って極めて困難であり、そしてこの分子を安定な薬理配合物の中に配合するためには特別に選ばれた手段を必要とする。

更に、G-CSFを含む液状薬理製剤の主たる欠点は、それらが比較的濁り物をとりわけ長期保存の際に又は流通経路に基づく輸送の際に、形成し易い性質にある。更に、即時投与型溶液は機械的なストレスに対して非常に敏感であることが認められている。機械的

なストレス、例えば溶液の振盪は、様々な、且つ無秩序な状態の輸送中に液状薬理製剤に影響を及ぼしうる。また、アンプル又はバイアルの中に充填された薬理溶液に及ぼす不適切な取扱い、それ故考えられる機械的ストレスは、医師、看護人又は患者による使用の際に完全に排除することはできない。従って、機械的ストレスに対する強健さは、タンパク質を含む薬理剤にとっての品質基準である。機械的ストレスに対するG-CSFの安定性の維持のための手段は従来の文献の中に記載されていない。慣用の方法に従って調製したG-CSFの液状製剤は高温に保存したときでさえも適度な安定性を有してはいるが、機械的ストレスに対するかかる配合物の安定性は全てのケースにおいて満足たるものではない。特に、目に見える濁り物が往々にして薬理溶液の中に認められ、それはG-CSFの二量体又は凝集体の形成を原因とする。液状薬理製剤におけるかかる変化は、とりわけ個別の投与形態物の中に含まれている活性物質の量に有害な影響を及ぼし、そして医学の観点から可能な限り回避されるべきである。

本発明の目的はG-CSFの安定な液状薬理製剤を提供することにあり、これは薬剤としてのG-CSFの適正な利用を可能とし、そして上記した公知の薬理製剤の欠点を有さない。特に、この薬理製剤は、長い棚寿命を有し、機械的ストレス

に対して安定であり、生理学的によく寛容され、簡単に使用でき、そして正確に投与可能であるべきである。特に、生理学的に適合性はpH値を有すべきである。

驚くべきことに、安定な水性薬理製剤は、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩又はリン酸塩の群から選ばれる緩衝剤を添加剤として使用したときに、本発明の概念において製造できることが見い出された。これらは好ましくは、各ケースにおいて選択された緩衝剤の濃度が、市場に出る既時投与型薬理製剤の中で2~100mmol/lの量において用いられる。驚くべきことに、この方法で製造した溶液は機械的ストレスに対して実質的に安定である。更に、それらは、緩衝剤の選択を通じて、4~5又は7~8の有利なpH値を有する溶液を供することができる点で有利であり、ここで従来技術で知られる溶液は好ましくはタンパク質の安定化のために2.5~3.5pH値を有する溶液を必要とする。

本発明に従って製造した製剤の追加の利点は、医学の見地から問題となりうるタンパク質様又はポリマー助剤を含まないことがある。G-CSFを含む液状薬理製剤は7~8のpH値で、即ち、血液のpH値(pH7.2~7.4)に低いpH値で製造できるようになったため、それらは寛容され、且つ痛みを実質的に伴わずに投与可能である利点もある。

更なる利点は、助剤の選択により、液状薬理製剤において従来必要とされてきた比較的大量の界面活性剤がもはや必要でないことがある。対照的に、0.5mg/ml以下、好ましくは0.01~0.1mg/mlの低い界面活性剤の量がG-CSFを安定化するのに適当である。単位容量当たりに使用するG-CSFタンパク質の量より低い又は最大でそれと同じの界面活性剤の濃度(mg/ml)を好適に利用できる。このことはG-CSFの皮下投与を意図する液状薬理製剤にとって極めて好都合である。更に、本発明に係る手段は特に不安定な非グリコシル化G-CSF分子の薬理製剤の適切な安定化を招く。助剤の特定の選択は、全体的に非常によく寛容され、且つタンパク質安定性に関して品質的に高級な製剤を代表する薬理製剤を供する。

本発明に係るG-CSF含有薬理製剤は活性成分を、治療的効果に達成せしめるのに適当な量で含む。通常、0.01~5mg/ml、好ましくは0.1~1.5mg/mlの活性

物質の濃度が使用される。

酢酸、クエン酸、乳酸、マレイン酸及びリン酸、又はその生理学

的に寛容されている塩は薬理助剤及び緩衝剤として本発明に従って使用される。

この助剤溶液の製造において、これらの緩衝剤は対応の遊離酸の形態において、又はアルカリ、アルカリ土類もしくはアンモニウム塩の形態のいづれかにおいて存在しうる。この溶液は更に一般の薬理助剤を含みうる。液状薬理製剤の製造中の様々な助剤又は活性物質の添加の順序は本発明に従って認められる貯蔵における安定化効果とは完全に独立しており、そして当業者の判断にある。溶液の所望のpHはアルカリ水酸化物、アルカリ土類水酸化物又は水酸化アンモニウムの如くの塩基を加えることにより調整される。水酸化ナトリウムがこのために好適に利用される。所望のpH値の調整は塩基溶液の添加により主に達成されうる。一般に、強塩基と弱酸との塩、例えば酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムもしくはニカリウム又は炭酸ナトリウムがこの目的のために考慮される。もし助剤の薬理溶液が塩基性のpH値を有するなら、それは4~5又は7~8の所望のpH域が達せられるに至るまでの酸の滴定により調整される。生理学的に寛容される無機又は有機酸、例えば塩酸、リン酸、酢酸、クエン酸又は酸性のpH値を有する慣用の物質の溶液が考慮される。これに関して好適な物質は、塩酸と弱塩基との塩、例えばリン酸二水素ナトリウム又はリン酸二水素カリウムである。

アルギニン及びその塩を薬理助剤及び緩衝剤として本発明に従って使用される。

即時投与型液状薬理製剤中の緩衝剤、酢酸、クエン酸、乳酸、マレイン酸又はリン酸の濃度は好ましくは各ケースにおいて約2~100mmol/1である。上記の酸は薬理助剤の製造中にその塩の形態で通常使用される事実に基づき、その遊離酸の形態においてはあまりよく使用されないため、便宜上各ケースにおいて、以下ではこれら

の酸、即ち、例えば酢酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩又はリン酸塩の

陰イオン濃度で言及する。緩衝剤の総濃度は100mmol／1、好ましくは80mol／1の値を越えないべきである。緩衝剤の濃度は好ましくは約5～40mmol／1である。

特定の緩衝剤との組合せにおける液状薬理製剤の特定のpH域は極めて安定な溶液をもたらしめることが認められた。酢酸又は乳酸緩衝剤を5～40mmol／1の濃度で使用し、そしてこの溶液のpH値を約2～5の域に調整すると、機械的ストレスに対して極めて安定である薬理製剤が得られる。以下の緩衝剤濃度及びpH値が好適に利用される：5～80mmol／1、特に10～30mmol／1の酢酸又は乳酸及びpH3.5～5。

クエン酸塩は5～40mmol／1、好ましくは5～20mmol／1の濃度において使用される。緩衝剤、クエン酸塩とリン酸塩との組合せは、緩衝剤の総濃度が10～40mmol／1、好ましくは15～30mmol／1であるケースにおいて好適に利用される。液状薬理製剤のpH値は好ましくは約2.5～3.5又は7～7.5の域にある。

マレイン酸塩は5～40mmol／1の濃度において好適に使用される。この場合における液状薬理製剤のpH値は好ましくは約2.5～3.5又は7～7.5の域にある。

リン酸塩は5～80mmol／1、好ましくは5～30mmol／1の濃度において、単独で、又は他の緩衝剤のうちの一つと組合せて使用される。リン酸緩衝剤のみを含む液状薬理製剤のpH値は好ましくは約3.5～5、又は7～8の域にある。

リン酸アルギニン、塩化アルギニン及びクエン酸アルギニン緩衝剤は2～100mmol／1、好ましくは5～80mmol／1の濃度においても使用される。アルギニン緩衝剤を含む液状製剤のpH値は約7～8、好ましくは7～7.5である。

生理学的に寛容されるpH値及び生理学的に寛容される濃度での本発明に係る緩衝系の記載の選択は、再溶解により凍結乾燥品又は粉末から調製するG-CSFの溶液の場合においても良好な概念であり、且つ有利である。

凍結乾燥品を再溶解するときは機械的攪拌（振盪）を与えるものであるため、このケースにおいては特定の緩衝系及びpH値を特別に選択することが重要である。本発明の範囲に属さない緩衝系又はpH値の選択は凝集体、濁り物の形成を、そしてそれ故低品質製品を招いてしまいうる。

これに関連して、本発明に係るpH値及び緩衝系を生み出すのに必要とされる酸、塩、塩基を凍結乾燥品に含ませるか、もしくは溶解のために用いる水性溶液に含ませるか、又は成分に含ませるかは当業者に任せられる。

本発明に係る水性製剤は慣用の凍結乾燥により凍結乾燥品を作るのに、又は例えばスプレー乾燥により粉末を作るのに利用できうる。本発明に係る製剤は水又は水性溶液の中にこれらを溶解することによって得られる。7~7.5のpH域におけるアルギニン緩衝剤を含む再溶解凍結乾燥品は少なくとも24時間安定であることが認められた。

前記緩衝剤により可能であるG-CSF分子の安定化は組換プロセス及びその変法により作られる全てのG-CSF分子主に関係する。本発明に係る該G-CSF又はG-CSF変異体には、全ての天然G-CSF変異体及びそれに由来する組換DNA技術により修飾されたG-CSFタンパク質、特にG-CSF部に加えてその他のタンパク質配列を追加的に含む融合タンパク質が含まれる。これに關係して、原核細胞における発現にとって適當な-1位においてN-末端Met残基を有するG-CSFムテインが特に好適である。PCT/EP91/00192に従

って作れる組換メチオン非含有G-CSF変異体が同等に適當である。「G-CSF変異体」なる語は、1又は数個のアミノ酸が欠失しているか、又は別のアミノ酸により置換されており、G-CSFの本質的な特性が實質的に維持されているG-CSF分子を含むものと解される。適當なG-CSFムテインは例えばEP0, 456, 200号に記載されている。

G-CSFを含む溶液の濁度の測定は、機械的ストレスに対する液状薬理製剤の安定性を試験するのに極めて適當である。機械的なストレスに委ねられた後のタンパク質溶液の濁度の評価は、簡単に実施できる試験法として極めて有用である。濁りの発生はポリマー、オリゴマー及び凝集体の生成に関連する。あるケースにおいては、光学的評価は、二量体及び凝集体を検定するためのより特別な方法(例えばHPLC)よりも優れていることが証明されており、その理由は濁度法の場合、HPCLの場合の如くのように必要とされるサンプル準備により定量の際に大きな凝集体を除くようなことはせず、その代わり、もとの容器の中で評価され、そ

れ故信頼をもって検定されうる。濁り現象の定量は市販の濁度計、散乱光光度計等により簡単に実施できる。かかる結果の評価は、濁度についての水準点であつて、それ以下であると溶液が清浄であるか又はわずかに濁っているものであると認められる水準点の如くを規定する薬局規定へと変換することもできる。

活性物質及び安定化のために用いる助剤の浸透圧特性によっては等張性が前もって達成されていないなら、寛容性のよい非経口薬理製剤の製造のために等張的に働く助剤を加えることが期待される。この目的のため、非イオン型の寛容性のよい助剤、例えばマンニトール、グリセロール又はのその他の糖アルコールが主として利用される。

G-CSFの場合、マンニトールが好適に利用されるが、これはG-CSFの安定性にとって重要でない。このタンパク質はマンニトール非含有製剤の中でも同等に安定であるが、しかしこのような溶液は等張性を欠くことであまり寛容されない。

等張性を調整するために塩を加えることは好適でなく、その理由は高濃度の塩又はイオンはG-CSF凝集体の生成を促進するからである。従って、塩は少量で加えることが好都合である。緩衝剤の濃度は、pH安定作用は達せられるが、しかしイオン強度は可能な限り低く保たれるように計算する。緩衝剤の濃度は好みくは $80\text{mmol}/1$ まで、特に好みくは $30\text{mmol}/1$ 未満の域とする。

即時投与型注射溶液は更なる慣用の助剤又は添加剤をも含みうる。酸化防止剤、例えばグルタチオン、アスコルビン酸又は類似の物質、カオトロピック助剤、例えば尿素、及びアミノ酸、例えばアルギニン、リジン、オルチニン等を加えてよい。

本発明を以下において例示的な実施態様を基礎により詳しく説明する。

#### 実施例1：

##### 液状薬理製剤を製造するための一般手順

本実施例において用いるG-CSFの溶液は、記載の助剤を注射用水の中に溶かし、G-CSFを記載の量で加え、そして必要ならばpHを少量の緩衝剤成分で正確な標的値に合わせることにより調製する。次にこの溶液を孔サイズ $0.2\mu\text{m}$ の適

当な滅菌膜フィルターを介して濾過し、次いで加水分解クラスⅠのガラスで出来た注射バイアルの中に充填し、そして滅菌済みのテフロン処理ゴム栓で閉じる。この充填は好ましくは窒素雰囲気下で行う。

### 実施例2：

#### 安定性の決定のための試験方法

閉じたフランジ付きのバイアルを暗所において規定の保存温度において保存し、その後、タンパク質の純度について並びに凝集体及び二量体の発生について、逆相HPLC (RP-HPLC)、ゲルクロマトグラフィー又はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC HPLC) により調べた。利用した方法を以下に説明する：

##### 2. 1 逆相HPLC

RP-HPLCはNucleosil C18カラム (Knauer Company) を用いて実施した。移動相は0.12% (V/V) のトリフルオロ酢酸 (TFA) /水 (A) 及び0.1% (V/V) のTFA/アセトニトリル (B) より成る。クロマトグラフィーはAからBに至る直線勾配を利用し、0.5ml/minの流速で実施した。

注射量は配合に依存して3～6 μgのG-CSFとした。これは外部標準を利用して214nmの波長においてピーク面積を介して評価した。

##### 2. 2 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

SEクロマトグラフィーのためにはTSK G2000SW分離カラム (7.5×300mm) を利用した。分離は室温においてイソクラチック的に、リン酸緩衝液 (22.2mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 107.7mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH6.2) 中で0.6ml/minの流速において実施した。

注射量は3～6 μgのG-CSFとした。これは外部標準を用い、214nmの検出波長においてピーク面積を介して評価した。

##### 2. 3 SDS PAGE/ウェスタンプロット

3 μgのrhG-CSFを非還元式条件下で12%のポリアクリルアミドSDSゲルに載せ、そしてゲル電気泳動にかけた。そして、分子量に応じて分離したG-CSFモノマー、二量体又は凝集体をエレクトロ blottingによりニトロセルロースに転写させた。タンパク質

バンドを特異的なポリクローナルビオチニル化抗-G-CSF抗体 (PAB<GCSF> Ig G) とのインキュベーション並びにストレプトアビシンーアルカリホスファターゼコンジュゲート (SA-APコンジュゲート)、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP) 及びニトロブルートラゾリウム (NBT) を用いるホスファターゼ技術を介する検出により同定する。

モノマー、二量体及び凝集体の%量を、一式のrhG-CSF標準品の助けを借りてレーザーデンシトメーター評価により決定した。

#### 2. 4 NFS-60バイオアッセイ (生物活性)

G-CSF活性のインビトロ決定は、G-CSFにより刺激したNFS-60細胞の細胞培養物中の細胞数の測定を基礎とする。

適当な条件下で、細胞のデヒドログナーゼ活性を培地中のG-CSFの濃度と相関させることが可能である。G-CSF緩衝溶液の適度な希釀品をデヒドログナーゼ活性の容易に測定可能な上昇を獲得するために調製する。

その活性を570及び690nmにおいて測光的に測定した。テトラゾリウム塩MTT (黄) からホルマザン (青) に至る還元を測定した。

G-CSFのインビトロ活性を、サンプルについてのデーターを平行線法に従って標準品と比較することにより計算した。これはph. Eur. の条件に従って評価した (VIII. 13)。

#### 2. 5 測光OD280 (タンパク質含量)

G-CSF UVスペクトルは280nmにおいて最大吸収を有しており、このことはトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニン残基の如くの側鎖原子団に基づく。測定は凝葉溶液との対比において、

—UV光度計

(例えば、Uvikon 810P又は941, Kontron Instruments)

—セミーミクロ石英キュベット、 $500\mu\text{l}$ 、経路：1cm (例えば

、Hellma, Suprasil, Cat. No. 104. 00213-QS)

を介して行った。

#### 2. 6 散乱光測定；濁度測定

この測定はガラスキュベット（直径2cm）中の未希釈生成溶液で直接行った。液体により拡散偏向した散乱光を90°の角度において測定する。これはDIN38404 C2に従ってホルマジン標準懸濁物と対比して測定し、値はTU/Fで記す。測定は適當な濁度光測計、例えばLTP5 (Dr. Lange Company Diisseldorf) で実施する。

### 実施例3：

#### 機械的ストレスキャパシティー（濁り）についての調査

0.5mg/1の濃度のG-CSF溶液を下記に記載の緩衝剤による透析によって調製した。機械的ストレス後に生ずる濁りを決定するため、各ケースにおいて1mlのサンプルを加水分解用クラスIのガラスより成る注射ボトルの中に分注し、そして栓で閉じた。サンプルを研究室用振盪装置 (Heidolph Company) で最大強度において10秒間処理した。この機械的ストレス工程の直後、散乱光測定を各ケースにおいて360nmのEX及びEM波長でHitachi F4000蛍光光度計を用いて実施した360nmでの下記の散乱光強度は利用してpH値及び緩衝剤との関連で示す。酢酸塩及びクエン酸塩緩衝剤の記載のモル濃度は利用した酢酸及びクエン酸のモル濃度に相関する。適度なpH値は水酸化ナトリウム溶液で調整した。リン酸塩/クエン酸塩緩衝剤は、適量のクエン酸を加え、そしてそのpHをリン酸水素二ナトリウムで調整することにより調製した。リン酸塩緩衝剤は所定のモル濃度のリン酸水素ナトリウムを加え、そしてそのpH値をリン酸又はリン酸水素二ナトリウムで調整することにより調製した。

### 実施例4：

G-CSFの液状薬理製剤を実施例1に記載の通りに調製し、そし

てこの溶液のpH値を4.5に調整した。この製剤は表1に記載の成分を含んだ：

表1: pH4.5 の G-CSF 溶液

	配合1	配合2
G-CSF	0.25mg	0.25mg
マンニトール	25mg	25mg
ポリソルベート80	0.02mg	0.02mg
緩衝剤	クエン酸塩／リン酸塩	リン酸塩
	5 mmol/l	5 mmol/l
水	0.5mlまで	0.5mlまで
pH	4.5	4.5

	配合3	配合4
G-CSF	0.25mg	0.25mg
マンニトール	-	25mg
ポリソルベート80	0.02mg	0.02mg
緩衝剤	リン酸塩	酢酸塩
	5 mmol/l	10mmol/l
水	0.5mlまで	0.5mlまで
pH	4.5	4.5

## a) タンパク質の純度の静置貯蔵との関係の結果

RP HPLC, SEC HPLC及びウェスタンプロットによる液状配合物1～4の分析は、未変化のタンパク質の純度が>99%であり、そしてG-CSFの二量体又は凝集体が検出できなかったことを示す。これらの結果は、配合物1～4を、4～8℃で6ヶ月間保存後、+30℃

で4週間保存後、及び+40℃で4週間保存後、得た。これらの結果は、pH4.5及び様々な貯蔵条件下でのG-CSFの溶液が、固定貯蔵条件との関係で実質的に安定であると特定できることを示している。

## b) 機械的ストレスを経てのタンパク質純度についての結果

ところで、静置して保存したときの生理化学的安定性にとっての溶液の緩衝剤及び適切なpHの選択は、機械的ストレスを経た安定性に関するものとは異なる。その安定性は酢酸塩及びリン酸塩緩衝剤中のpH4.5において達成されるが、しかしクエン酸／リン酸塩の緩衝剤混合物中では達成されない。得られた個々の結果を以下の表に示す：

表2：

	4～8℃で6ヶ月後の濁度	機械的ストレス後の濁度 製造直後 4～8℃にて 40℃にて		
配合1	なし	強	強	強
配合2	なし	なし	なし	なし
配合3	なし	なし	なし	なし
配合4	なし	なし	なし	なし

実施例5：

様々な緩衝剤系及び各ケースにおいて0.005%（図2及び3においては0.05%）のポリソルベート80を含むG-CSF溶液を実施例3記載の通りに調製した。調べた各緩衝剤系について、0.5pH単位の間隔で2～7.5の間のpHが異なる様々な溶液を調製した（即ち、一緩衝剤系当たり13の溶液）。これらの溶液の機械的ストレス耐性を散乱光測定法を利用して上記の方法により調べた（実施例3）。以下の緩衝剤系を調べた（G-CSF及びその他の助剤の含有量は実施例3に記載の通り）：

- 5. 1 酢酸塩 10mmol/1
- 5. 2 酢酸塩 20mmol/1
- 5. 3 酢酸塩 40mmol/1
- 5. 4 リン酸塩 20mmol/1
- 5. 5 リン酸塩／クエン酸塩 全部で20mmol/1、  
10mmol/1 リン酸塩を含む
- 5. 6 乳酸塩 10mmol/1

5. 7 マレイン酸塩 10mmol／1

5. 8 クエン酸塩 20mmol／1

散乱光は、機械的ストレスを完了させた後の溶液のpH値との関係において測定した。その結果を図1～4に示す。これらは、各緩衝剤についてのpH濁度曲線の個々の形態を示す。クエン酸塩は4～6.5のpH域において特に不適当である；クエン酸塩／リン酸塩緩衝剤は4.5～6.5のpH域において不適当である；酢酸塩は約5～7のpH域において不適当であり、そしてリン酸塩は約5～6.75のpH域において不適当である。乳酸塩は、酢酸塩、マレイン酸塩及びクエン酸塩／リン酸塩の如くのように挙動する。

#### 実施例6：

緩衝剤の濃度及びpH値との関連での、0.5mg／mlのTween20を含む0.35mg／mlの濃度のG-CSF溶液の機械的安定性の調査

約5mg／mlの濃度のG-CSF溶液を下記の緩衝溶液により、0.35mg／mlの活性物質の含有量に至るまで希釈した。緩衝溶液は全て0.05%のポリソルベート80を含んだ。この緩衝溶液は、まず記載のモル濃度の関連の塩基塩成分を加え、次いで対応の酸を用いて記載の値に至るまでpH値を調整することによって調製した。このようにして得られたG-CSF緩衝溶液を加水分解クラスIのガラスより成る注射ボトルの中に10mlの量で分注し適当な栓で閉じ、そして実験室

振盪装置（例えば、Heidolph Company）の上で最大強度において10秒間振盪させた。約10分の標準時間を経て、ホルマジン標準品（German Pharmacopeia）に対して検量した濁度値（TU／F）をDr. Lange CompanyのLTP5散乱光光度計（90°Cの角度において測定）により決定した。

表3a：未振盪溶液の濁度

	酢酸塩 緩衝剤	リン酸塩 緩衝剤	クエン酸塩 緩衝剤	
	TU/F	TU/F	TU/F	
80mmol	pH7.5 pH7 pH5 pH4.5 pH4 pH3.5	0.56 0.47 0.55 0.36 0.39 0.3	0.58 0.51 0.47 0.47 0.46 0.54	0.51 0.43 0.48 0.46 0.41 0.41
	pH7.5 pH7 pH5 pH4.5 pH4 pH3.5	0.57 0.51 0.62 0.42 0.44 0.42	0.4 0.37 0.4 0.58 0.41 0.43	0.45 0.39 0.48 0.52 0.55 0.37
	pH7.5 pH7 pH5 pH4.5 pH4 pH3.5	0.65 0.8 0.62 0.47 0.44 0.49	0.39 0.46 0.49 0.42 0.43 0.37	0.4 0.4 0.39 0.39 0.47 0.38
	pH7.5 pH7 pH5 pH4.5 pH4 pH3.5	0.54 0.68 0.42 0.37 0.35 0.4	0.43 0.38 0.41 0.45 0.36 0.43	0.55 0.49 0.55 0.43 0.44 0.42
	pH7.5 pH7 pH5 pH4.5 pH4 pH3.5	0.83 0.63 0.65 0.42 0.4 0.38	0.57 0.37 0.41 0.4 0.4 0.48	0.35 0.37 0.42 0.31 0.64 0.44

表3 b : 振盪溶液の濁度

	酢酸塩 緩衝剤	リン酸塩 緩衝剤	クエン酸塩 緩衝剤
	TU/F	TU/F	TU/F
80mmol	pH7.5	1.49	0.74
	pH7	1.94	0.77
	pH5	0.73	0.75
	pH4.5	0.42	0.68
	pH4	0.45	0.57
	pH3.5	0.32	0.66
40mmol	pH7.5	1.52	0.7
	pH7	1.24	0.58
	pH5	0.8	0.6
	pH4.5	0.5	0.64
	pH4	0.63	0.62
	pH3.5	0.55	0.64
20mmol	pH7.5	2.2	0.45
	pH7	2.9	0.6
	pH5	0.7	0.77
	pH4.5	0.55	0.48
	pH4	0.56	0.5
	pH3.5	0.43	0.4
10mmol	pH7.5	1.22	0.59
	pH7	1.4	0.46
	pH5	0.47	0.51
	pH4.5	0.43	0.45
	pH4	0.47	0.38
	pH3.5	0.44	0.51
5 mmol	pH7.5	2	0.76
	pH7	1.4	0.6
	pH5	0.47	0.51
	pH4.5	0.43	0.44
	pH4	0.47	0.44
	pH3.5	0.44	0.5

このデーターは、調べたpH域におけるリン酸緩衝剤が、5～80mmol／1のモル濃度全体にわたって、機械的ストレスのもとで若干上昇しながらも、濁りについて低い値を示すことを示した。

酢酸塩緩衝剤は機械的ストレスのもとでさも3.5～4.5のpH域において濁りについて非常に低い値を示した。

5～40mmol／1の濃度のクエン酸緩衝剤は7～7.5のpH域において安定化にとって適当である。

実施例7：

等張性添加剤に加えて、酸化防止剤及びカオトロピック助剤の群由来の更なる助剤を一部に加えてある、7.0~7.5のpH域の液状配合物を述べる。

下記の配合物を調製するため、適当な助剤を注射用水の中に溶かし、G-CSFを加え、そして必要ならばpH値を少量の適当な緩衝成分により正確に調整した。これらの溶液を0.2μmの孔サイズの滅菌膜フィルターでの濾過により除菌し、そして無菌条件下で、加水分解クラスIのガラスより成る、そして滅菌のテフロン処理ゴム栓で閉じた滅菌注射ボトルの中に分注し、そして滅菌のテフロン処理ゴム栓で閉じた。分注は窒素雰囲気下で行った。法兰ジ付き注射ボトルを暗所の中で規定の保存温度において検査まで保存した。実施例2及び3記載の方法を検査のために利用した。

表4a：液状G-CSF 製剤；pH 7

	配合5	配合6	配合7
G-CSF	0.35mg	0.35mg	0.35mg
ポリソルベート	0.1mg	0.1mg	0.1mg
マンニトール	40mg	40mg	40mg
緩衝剤	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 1.5mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 1.5mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O 1.5mg
グルタチオン	-	0.5mg	-
尿素	-	-	5 mg
注射用水	1 mlまで	1 mlまで	1 mlまで

表4 b : pH 7 での G-CSF 液状配合物についての分析データー

	4 - 8 °C において 4 週間貯蔵		
	I	II	III
配合 5	>99%	>99%	2.7%
配合 6	99%	>99%	4.8%
配合 7	>99%	>99%	0.6%

I. RP HPLCにおいて未変化のタンパク質の純度

II. SEC HPLC において未変化のタンパク質の純度

III. ウエスタンプロットにおける二量体／凝集体

表4 b の分析データーは、pH 7 及び記載の緩衝剤濃度において、安定溶液が得られ、そして4週間の貯蔵を経たタンパク質の純度がほとんど無変化であり続けたことを示す (> 90%)。

#### 実施例8 :

G-CSFの溶液を調製し、それにおいて一の溶液は本発明に従ってリン酸塩緩衝剤を含み、且つ4.5のpH値を有する（配合8）。第二の溶液は比較の目的で調製し、これは6.5のpH値を有する（配合9）。

医薬物質溶液を調製するため、助剤を注射用水に溶かし、次いでG-CSFを加える。その溶液を滅菌0.2 μmの膜フィルターで濾過することにより除菌し、加水分解クラスIのバイアルに分注し、そしてこれらをテフロン栓で閉じた。その後、それらを実験室振盪装置（Heidolph Company）で10分間処理した。その溶液を実施例2及び3記載の方法を用いて調べた。

表5a：配合物の組成

	配合8	配合9
G-CSF	0.350mg	0.250mg
Tween 80	0.1mg	-
Tween 20	-	0.1mg
ヒト血清アルブミン	-	1mg
マンニトール	50mg	50mg
リン酸緩衝剤	5 mmol/l	5 mmol/l
pH	4.5	6.5
注射用水	1mlまで	1mlまで

表5b：分析結果（ウェスタンプロット）

	配合5	配合6
機械的ストレス抜き	0.8%の二量体 凝集体なし	1.1%の二量体 凝集体なし
機械的ストレス後	1.1%の二量体 凝集体なし	2.7%の二量体 6.9%の凝集体

表に示す結果は、ヒト血清アルブミンの添加でさえも、機械的ストレスにより生ずるpH6.5でのタンパク質の凝集及び二量化を阻止することができないことを示す。一方、機械的ストレスに対して安定な溶液が、たとえヒト血清アルブミンが安定剤として存在していなくても4.5のpHにおいて獲得できる。

#### 実施例9：

##### 長期安定性

G-CSF注射溶液を、0.35mg/mlのG-CSFを50mg/mlのマンニトール、0.1mg/mlのポリソルベート80及び0.5mgのリン酸の溶液の中に溶かし、そしてリン酸水素ナトリウムにより攪拌しながらpH4.5に調整することにより調製した。この

溶液の調製及び分注は窒素下で行った。その透明な溶液を $0.2\mu\text{m}$ の孔サイズを有する滅菌膜フィルターを用いて濾過することにより除菌し、その後加水分解クラスIの注射ボトルに分注し、そして適当なゴム栓で閉じた。G-CSFを含む薬理製剤を $+4\sim+8^\circ\text{C}$ 及び $+20\sim+25^\circ\text{C}$ の温度で9ヶ月保存した。

表6：4～8°Cでの長期安定性

	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月
生物活性 80% - 125 %	該当	該当	該当
ウェスタンブロット % 凝集体 % 二量体	n.d. < 1 %	n.d. < 1 %	n.d. < 1 %
SDS Page % 第二ピーク	< 1 %	< 1 %	< 1 %
RP-HPLC 生成物ピーク	> 99 %	> 99 %	> 99 %
SEC HPLC 生成物ピーク 第二ピーク	> 98 % < 1 %	> 98 % < 1 %	> 98 % < 1 %
濁度 TU/F	0.7	0.7	0.7
OD280	0.359	0.362	0.357

実施例10：

約5mg/mlの濃度を有するG-CSF溶液を下記の緩衝溶液を用いて0.35mg/mlの活性物質含有量に至るまで希釈した。緩衝溶液は全て0.05%のポリソルベート80を含んだ。これらの緩衝溶液はアルギ

ニンを記載のモル量において5～80mmol/lで加え、次いでそのpH値をリン酸又は塩酸又はクエン酸で調整することにより調製した。このようにして得たG-CSF緩衝溶液を加水分解クラスIのガラスより成る注射ボトルに10mlの量で分注し、適當な栓で閉じ、そして実験室振盪装置（例えば、Heidolph Co.）上で最大強度で10秒間振盪した。約10分の標準時間後、ホルマジン標準品（German Pharmacopeia）に対して検量した濁度値（TU/F）をDr. Lange CompanyのLTP5散乱光光

度計 (90° の角度で測定) で決定した。

未振盪及び振盪溶液の平均濁度値を表7に示す。アルギニン緩衝系の様々なモル濃度 (5, 10, 20, 40, 80mmol) は各ケースにおいて同じ結果をもたらした。

7.0~7.5のpH域のアルギニン緩衝剤は機械的ストレスに対して極めてよく作用することが認められた。アルギニン緩衝剤は、凍結乾燥品を溶解することによって調製した溶液の中で特に好都合に利用できる。

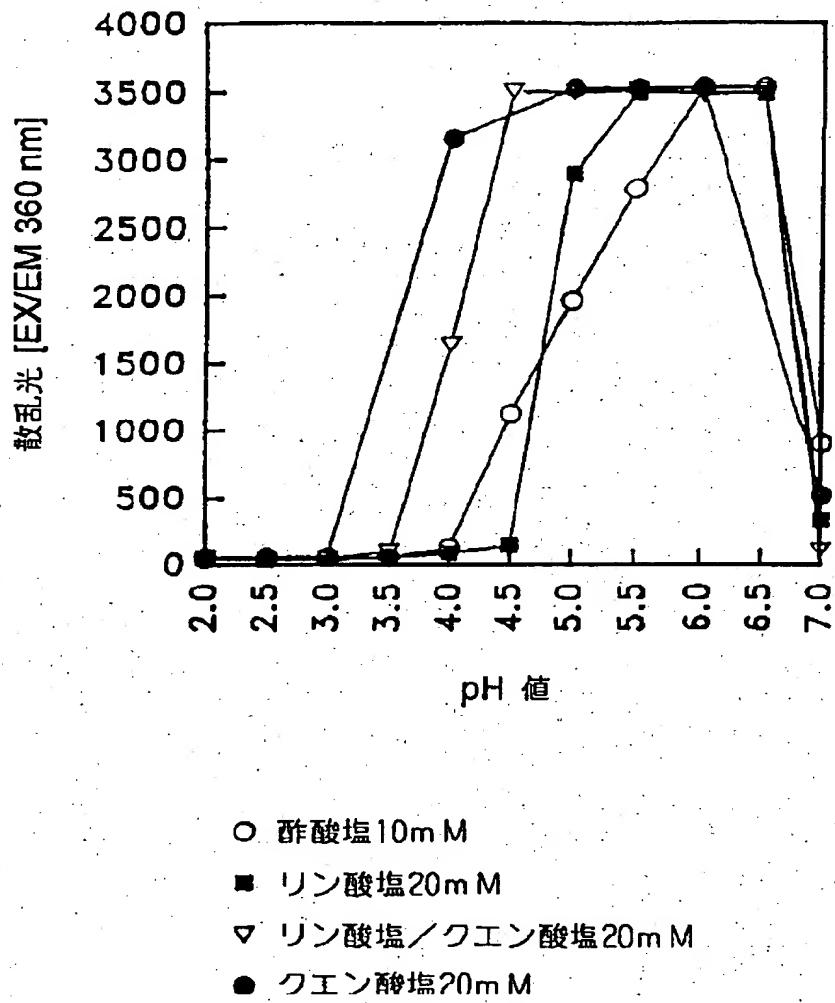
表7：アルギニン緩衝剤を用いての濁度値

緩衝剤	アルギニン/ リン酸	アルギニン/ 塩酸	アルギニン/ クエン酸
pH7.5	0.40	0.42	0.51
pH7.0	0.43	0.54	0.76
未振盪			
pH7.5	0.49	0.62	0.53
pH7.0	0.58	0.69	0.84
未振盪			

平均モル 5-80mmol/l

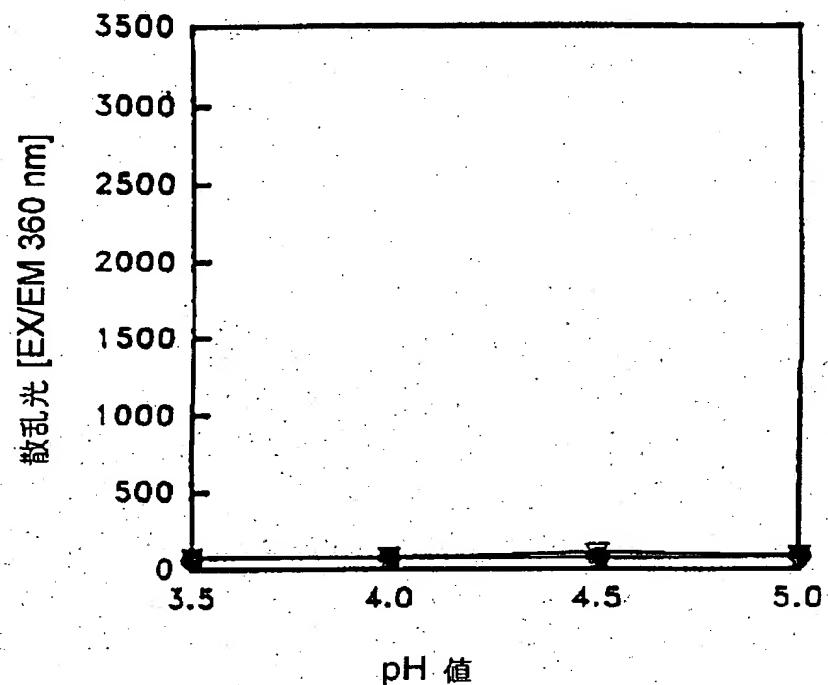
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2



【図3】

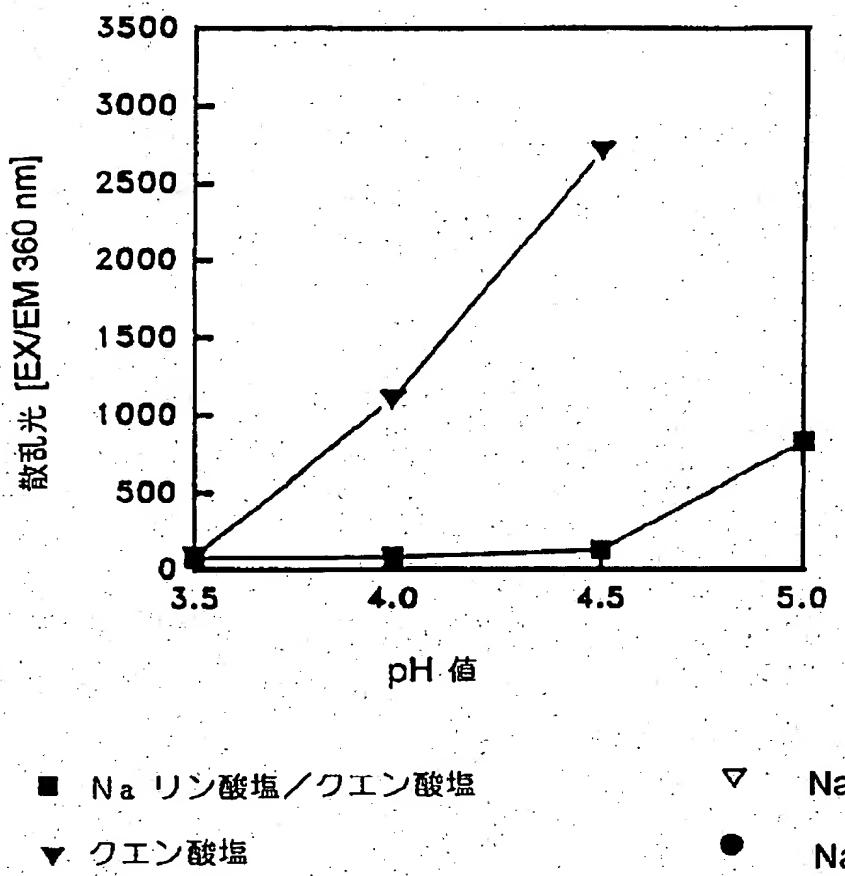
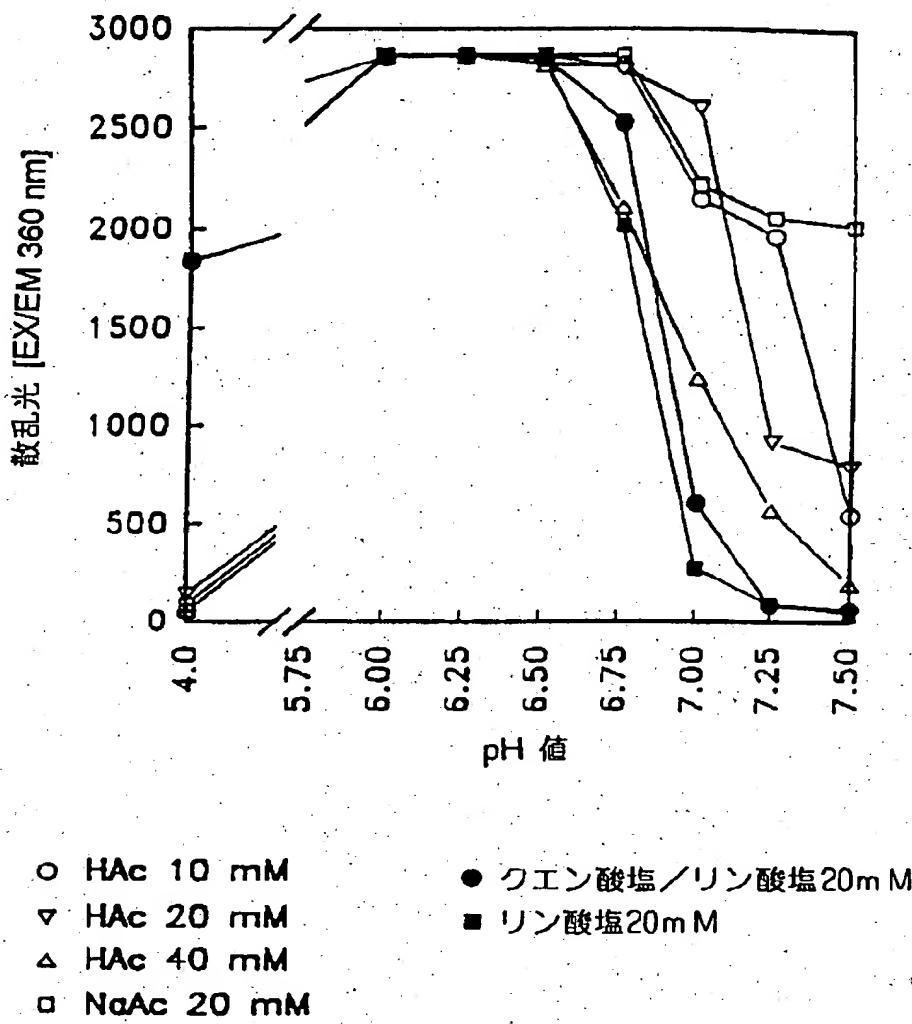


Figure 3

【図4】

Figure 4



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年11月11日

## 【補正内容】

表5a：配合物の組成

	配合8	配合9
G-CSF	0.350mg	0.250mg
Tween 80	0.1mg	-
Tween 20	-	0.1mg
ヒト血清アルブミン	-	1mg
マンニトール	50mg	50mg
リン酸緩衝剤	5 mmol/l	5 mmol/l
pH	4.5	6.5
注射用水	1mLまで	1mLまで

表5b：分析結果（ウェスタンプロット）

	配合8	配合9
機械的ストレス抜き	0.8%の二量体 凝集体なし	1.1%の二量体 凝集体なし
機械的ストレス後	1.1%の二量体 凝集体なし	2.7%の二量体 6.9%の凝集体

表に示す結果は、ヒト血清アルブミンの添加でさえも、機械的ストレスにより生ずるpH6.5でのタンパク質の凝集及び二量化を阻止することができないことを示す。一方、機械的ストレスに対して安定な溶液が、たとえヒト血清アルブミンが安定剤として存在していなくても4.5のpHにおいて獲得できる。

## 実施例の：

長期安定性

## 請求の範囲

1. 使用するG-CSFの量よりも少ない量の界面活性剤を含む治療的に有効な量のG-CSFを含み、且つ酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩又はアルギニン及びその塩を含んで成る群から選ばれる少なくとも一の緩衝剤を含む安定な水性薬理製剤であって、その既時投与型溶液中のこの緩衝剤の最終濃度が2～100mmol／1である、製剤。
2. 前記リン酸塩の濃度が5～80mmol／1であり、そして前記既時投与型溶液のpH値が約3.5～5又は7～8の値に調整されている、請求項1記載の製剤。
3. 前記クエン酸塩の濃度又は前記マレイン酸塩の濃度が5～40mmol／1であり、そして前記溶液のpH値が約2.5～3.5又は7～8の値に調整されている、請求項1記載の製剤。
4. 前記緩衝剤としてのリン酸塩とクエン酸塩との総濃度が5～40mmol／1であり、そしてその溶液のpH値が約2.5～3.5又は7～8に調整されている、請求項1記載の製剤。
5. 前記酢酸塩の濃度又は乳酸塩の濃度が5～80mmol／1であり、そして前記溶液のpH値が約3.5～5の値に調整されている、請求項1記載の製剤。
6. 前記リン酸アルギニン、塩化アルギニン又はクエン酸アルギニン緩衝剤の濃度が5～80mmol／1であり、そして前記溶液のpH値が好ましくは約7～8に調整されている、請求項1記載の製剤。
7. 前記溶液が、最大で0.5mg／ml、好ましくは0.01～0.1mg／mlの量の界面活性剤を含む、請求項1記載の製剤。
8. 前記溶液が更に一般的な助剤又は等張性剤を含む、請求項1～7のいずれか1項記載の製剤。
9. 前記溶液がポリマー又はタンパク質様助剤を含まない、請求項1～8のいずれか1項記載の製剤。
10. G-CSFを含む安定な水性薬理製剤の調整のための方法であって、薬理学的に有効な量のG-CSFを、使用するG-CSFの量より少ない量の界面活性剤と、並びに酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩、又はアルギニン

及びその塩を含んで成る群から選ばれる少なくとも一の緩衝剤と混合する方法であり、ここでその緩衝剤の量は既時投与型溶液中のこの緩衝剤の最終濃度が2～100mmol／1となるように選ぶ、方法。

11. G-CSFを含む水性薬理製剤を安定化するための方法であって、使用するG-CSFの量より少ない量の界面活性剤の他に、酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩、又はアルギニン及びその塩を含んで成る群から選ばれる少なくとも一の緩衝剤を、濁りを防ぐための安定剤としてその既時投与型溶液の中で2～100mmol／1の最終濃度において使用する、方法。

12. G-CSFを含む水性薬理製剤の場合における濁りの防止のための酢酸、乳酸、クエン酸、マレイン酸、リン酸及びその塩、又はアルギニン及びその塩の利用であって、ここでその既時投与型溶液中の緩衝剤の最終濃度が2～100mmol／1であり、そして緩衝剤を、使用するG-CSFの量より少ない量の界面活性剤と一緒に使用する、利用。

13. 請求項1～9のいづれか1項記載の製剤から製造した凍結乾燥品又は粉末。

14. 請求項13記載の凍結乾燥品又は粉末を水又は水性溶液の中に溶かすことにより製造した、請求項1～9のいづれか1項記載の製剤。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Item: Main Application No.  
PCT/EP 93/03544

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 A61K37/02 A61K9/14 A61K47/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 016, no. 289 (C-0956) 26 June 1992 & JP,A,04 077 434 (KANJI TANAKA) 11 March 1992 see abstract ---	1,7,10, 13
A	DE,A,37 23 781 (CHUGAI SEIYAKU K.K.) 21 January 1988 cited in the application see claims see examples ---	1-15
A	EP,A,0 373 679 (AMGEN INC.) 20 June 1990 cited in the application see claims see page 4, line 21 see page 4, line 38 ---	1-15 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"V" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"M" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

9 March 1994

16.03.94

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.O. Box 5000  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarpioni, U

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Appl. No.  
PCT/EP 93/03544

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 306 824 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 15 March 1989 cited in the application see claims see page 2, line 6 see page 2, line 55 see page 3, line 4 - line 8 ----	1-15
P,X	EP,A,0 528 314 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 February 1993 cited in the application see claims 1,3,11 see page 4, line 32 - line 33 see page 4, line 43 see page 5, line 12 - line 21 see page 5, line 44 - line 45 ----	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Appl. No.	Application No.
PCT/EP	93/03544

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE-A-3723781	21-01-88	AU-B-	611856	27-06-91
		AU-A-	7566587	21-01-88
		BE-A-	1000253	27-09-88
		CH-A-	671157	15-08-89
		FR-A-	2601591	22-01-88
		GB-A,B	2193631	17-02-88
		JP-A-	63146826	18-06-88
		NL-A-	8701640	16-02-88
		SE-A-	8702907	19-01-88
		JP-A-	63146827	18-06-88
		JP-A-	63152326	24-06-88
		JP-A-	63146828	18-06-88
EP-A-0373679	20-06-90	US-A-	5104651	14-04-92
		AU-B-	621695	19-03-92
		AU-A-	4668989	10-07-90
		CA-A-	2005143	16-06-90
		JP-T-	3502808	27-06-91
		WO-A-	9006762	28-06-90
EP-A-0306824	15-03-89	DE-A-	3729863	16-03-89
		AU-A-	2173988	27-04-89
		DE-A-	3872334	30-07-92
		JP-A-	1071818	16-03-89
		US-A-	4992419	12-02-91
EP-A-0528314	24-02-93	DE-A-	4126984	18-02-93
		AU-A-	2405292	16-03-93
		WO-A-	9303745	04-03-93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6 識別記号 庁内整理番号 F I  
A 61 K 47/18 Z 7433-4C

(72) 発明者 ピンテール, ゲルハルト  
ドイツ連邦共和国, デー-69221 ドッセ  
ンハイム, ヤーンシュトラーセ 20エー  
(72) 発明者 ボーグ, ハインリッヒ  
ドイツ連邦共和国, デー-69514 ロイデ  
ンバッハ, リンデンシュトラーセ 6